

Rec'd 2003/MAY/12 OCT 2004

FÜNF UND FÜFZIG

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND 511237

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 14 MAY 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 16 800.8

Anmeldetag: 15. April 2002

Anmelder/Inhaber: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg/DE

Bezeichnung: Doxycyclin-regulierbare Genexpression in
adenoviralen Vektoren für die Gentherapie maligner
Erkrankungen

IPC: C 12 N, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 31. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Faust

BEST AVAILABLE COPY

UEXKÜLL & STOLBERG
PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistr. 52
20246 Hamburg

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS

DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBOORG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT van HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DIPL.-ING. LARS MANKE
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSEN
DR. ALBRECHT von MENGES

15. 4. 2002
P 60235 We/aw

Doxycyclin-regulierbare Genexpression in adenoviralen
Vektoren für die Gentherapie maligner Erkrankungen

Die Erfindung betrifft rekombinante adenovirale Vektoren, die durch Doxycyclin hocheffizient supprimiert werden können sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in eukaryotischen Zellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.

Bösartige Erkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen des Menschen. Bei fortgeschrittenen und metastasierten soliden Tumorerkrankungen sind die therapeutischen Möglichkeiten immer noch sehr limitiert und das 5-Jahresüberleben vieler dieser Karzinomerkrankungen be-

trägt weniger als 10%. Daher stellt die metastasierte Karzinomerkrankung eine der größten Herausforderungen in der experimentellen Medizin dar. Durch Einschleusen therapeutischer Gene in Tumorzellen eröffneten gentherapeutische Ansätze neue Perspektiven in der Therapie dieser Erkrankungen.

Adenoviren ermöglichen den effizienten Transfer und die Expression therapeutischer Gene in verschiedene Gewebe und Zelllinien. Insbesondere die Weiterentwicklung rekombinanter adenoviraler Vektoren hat die experimentellen Ansätze in der adenoviralen Gentherapie maligner Erkrankungen ermöglicht (1).

Mit der hohen Effizienz des Gentransfers sind gentherapeutische Ansätze heute häufig durch die Toxizität infolge unkontrollierter Transgenexpression limitiert. Insbesondere bei der adenoviral vermittelten Expression von Zytokinen wie Interleukin-2, Interleukin-12, Interleukin-18 oder Tumor Nekrose Faktor α kann es auch bei intratumoraler Gabe der rekombinanten Adenoviren zu unerwarteten erheblichen systemischen Nebenwirkungen kommen. Eine den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor) vergleichbare Genexpression nach erfolgter adenoviraler Infektion mit rekombinanten Vektoren konnte bislang nicht effizient kontrolliert werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Entwicklung adenoviraler Vektoren für die Gentherapie solider Tumoren, die zum einen eine effiziente, den konstitutiven Promotoren (Cytomegalovirus-Promotor und Rous-Sarkoma-

virus-Promotor) vergleichbare oder sogar höhere Genexpression ermöglichen, zum anderen bei Auftreten transgenbedingter unerwünschter Nebenwirkungen durch Zugabe einer nichttoxischen Substanz diese Transgenexpression hochsignifikant supprimieren lassen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass die adenoviral vermittelte therapeutische Genexpression unter Kontrolle eines integrierten tetracyclin-regulierbaren Systems erfolgt. Die Verwendung einer autoregulierten, Doxycyclin- und Tetracyclin-abhängigen TetR-VP16 Transaktivator-Fusionsprotein-Expression ermöglicht dabei zusammen mit einem bicistronischen TetO-Promotorsystem sowohl die hohe Transgenexpression, als auch eine sehr effiziente Suppression in Gegenwart pharmakologischer Konzentrationen von Doxycyclin oder Tetracyclin.

Das Tet-System, welches erstmals in E.coli beschrieben wurde, ist ein geeignetes Werkzeug zur regulierten Genexpression. So konnte eine Suppression der Genexpression durch Zugabe von Doxycyclin unter Verwendung eines Tetracyclin-Repressors und eines dazugehörigen Operators erzielt werden. Für die Konstruktion der erfindungsgemäßen rekombinannten Adenoviren wurde dieses Systems weiterentwickelt. Dazu wurde das Tetracyclin induzierbare Repressor-Protein (tetR) mit der transkriptionellen Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus VP16 fusioniert. Im Vordergrund steht dabei nicht mehr die Inhibition durch Bindung des tetR an das Operon, sondern die Positionierung des VP16 Transaktivators (2, 3). Entsprechend wurde für unsere Erfindung auch ein heptamerisiertes TetO Operon mit zwei flankierenden

Minimalpromotoren (4) verwendet. Dieses System (Abb. 1) führt zur autoregulierten Transaktivator-Expression im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus über einen der Minimalpromotoren. Gleichzeitig wird ein therapeutisches Transgen über den anderen flankierenden Minimalpromoter exprimiert. Doxycyclin und Tetracyclin binden an die tetR-Komponente und eine Änderung der sterischen Konformation führt zu einem Verlust der Bindung des tetR an den Operator. Die Dissoziation des Transaktivators von den Minimalpromotoren hat dann eine Reduktion der Genexpression zur Folge.

Der hier beschriebene Ansatz stellt die erstmalige Verwendung dieses autoregulierten Systems in rekombinannten adenoviralen Vektoren dar.

Gegenstand der Erfindung sind daher insbesondere rekombinante Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9, ein Verfahren zur Genexpression nach den Ansprüchen 10 bis 13 sowie die Verwendung der Vektoren zur Genexpression bzw. in der Therapie maligner Erkrankungen.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Durchführung einer Genexpression in eukaryoten Zelllinien, bei dem zur Genexpression rekombinante adenovirale Vektoren verwendet werden, wobei die Genexpression durch einen bicistronischen Promotor vermittelt wird und zur Genexpression ein Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator-Fusionsprotein erzeugt wird. Das Tetracyclin- und Doxycyclin-regulierbare System wird vorzugsweise in die E1-Region rekombinanter Adenoviren kloniert wird. Alternativ kann es auch in die

E3- oder E4-Region rekombinanter Adenoviren kloniert sein.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform ist in dasselbe Adenovirus ein Tet-Operator zur Bindung des Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator Fusionsproteins integriert. Vorzugsweise wird der in die E1-Region rekombinanter Adenoviren integrierte Tet-Operator von 2 Promotoren flankiert, wobei einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator Fusionsproteins, eines Luciferase-Genes, eines Fluoreszenzprotein-Genes, eines Interleukin-12 Genes, eines Interleukin-18 Genes, eines Interleukin-2 Genes, eines single-chain Interleukin-12 Genes, eines Tumor Nekrose Faktor α Genes, eines Interferon- γ Genes oder eines Interleukin-12 Genes verwendet wird.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren, bei dem einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, zur Expression des BAX Genes, zur Expression des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, eines Thymidin-Kinase-Genes, eines Cytosin-Deaminase-Genes oder eines β -Galaktosidase-Genes verwendet wird.

Gemäß alternativer Ausführungsformen wird das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt, indem man das Tetracyclin- und Doxycyclin-regulierbare System in Adenoassoziierte Adenoviren (AAV). Vorzugsweise verwendet man als virale Vektoren rekombinante Retroviren, rekombinante Herpes Simplex Viren, rekombinante Retroviren, Hepatitis-B Viren, Hepatitis-C Viren oder HI Viren.

Zur Regulation der Genexpression wird erfindungsgemäß bevorzugt Doxycyclin verwendet. Gemäß einer besonderen Ausführungsform verwendet man Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin oder Minocyclin.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, bei dem Tet-Repressor-Fusionsproteine oder Tet-Repressor-Mutanten-Fusionsproteine zur Tetracyclin-supprimierbaren Genexpression verwendet werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Beispiels näher erläutert.

Beispiele

Klonierung und Amplifikation der Vektoren

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose Gelelektrophorese getrennt und aus der Agarose unter Verwendung eines Gel Extraktions-Kits (Qiagen, Valencia, USA) isoliert. Für die Propagierung von Plasmid-DNA wurden DH5 α E.coli Zellen verwendet. Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach einer modifizierten alkalischen Lyse und Aufreinigung über Ionen-Austauscher-Säulen (Qiagen). Vor Transfektion wurde eine LPS Kontamination durch Triton-X Extraktion reduziert. Das Plasmid pBIG3r wurde von Strathee (4) zur Verfügung gestellt. Die cDNA für die Firefly-Luciferase wurde aus pGL3basic (Promega, Madison, USA) mittels BglII und XbaI Verdau isoliert und in SpeI/BamHI geschnittenen pBIG3r kloniert (pBIG3rluc). Die

adenovirale Expressionskassette in pAd.CMV wurde durch Verdau mit XbaI und SalI entfernt und die Schnittstellen mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt. pBIG3rluc wurde dann mit PvuII und SalI verdaut und das Fragment mit der bicistronischen Expressionskassette in den pAd.CMV ligiert. Das daraus resultierende adenovirale Expressionsplasmid pAd.3r-luc beinhaltet die bidirektionale Expressionskassette, 5' flankiert von den Basen 1 - 456 des AD5 Genomes einschließlich des linken ITR sowie 3' flankiert die Basen 3346 - 5865 des AD5. Die Minimal TK-Promotor Expression des tTA war antiparallel und die Minimal CMV-Promotor Expression des Luciferase-Genes parallel zur adenoviralen E1 Transkription. Die murine single-chain Interleukin-12 cDNA entstammt pSFG.IL12 (R.C. Mulligan) nach Verdau mit NcoI und EcoRV. Dieses Fragment wurde in die NheI/SalI Site des pAd.3r-luc subkloniert und ersetzt somit das Luciferase-Gen.

Rekombinante E1 deletierte Adenoviren wurden nach Kalziumumphosphat vermittelte Kopräzipitation adenoviraler Expressionsplasmide mit pBHG10 in 293 Zellen (stabil E1-transformiert) generiert, Plaque-gereinigt, in 293 Zellen amplifiziert und CsCl Dichtegradienten-aufgereinigt. Die Titration der rekombinanten Adenoviren erfolgte mittels Plaque-Assay. Die Sequenz wurde nach Isolation viraler DNA (Qiagen DNA Blood Kit) mittels PCR bestimmt um Insertion, Transaktivatorsequenz und Orientierung zu überprüfen.

Ergebnisse

Nach Klonierung der Kassette zur autoregulierten, Doxycyclin-supprimierbaren Genexpression in die E1 Region rekombinanter, replikationsdefizienter Adenoviren (Abb. 2) konnte unter Verwendung von Markergenen (Luciferase) die Überlegenheit dieses Promotorsystems in Abwesenheit von Doxycyclin gegenüber dem in der adenoviralen Gentherapie weit verbreiteten Cytomegalovirus-Promotor

(CMV) gezeigt werden (Abb. 3). Die Genexpression war dabei etwa 2 Logstufen höher. Diese Ergebnisse belegen eine ausreichende Genexpression mit diesem 3r Promotor-System und legen die Vermutung nahe, dass eine gegenüber dem CMV reduzierte virale Dosis zur vergleichbaren Transgenexpression führt. Eine Reduktion der Expression unerwünschter adenoviraler Proteine wäre die Folge. In Gegenwart von Doxycyclin konnte dann eine über 2400-fache Suppression der Luciferase-Genexpression erzielt werden. Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung von rekombinanten Adenoviren zur autoregulierten und Doxycyclin-supprimierbaren Expression eines murinen Zytokines (murines sc-IL12). In einer Vielzahl verschiedener Tumormodelle ist der antitumorale Effekt von Interleukin-12 bereits gezeigt worden (5, 6). Mit Hilfe dieser Adenoviren konnte in vitro in verschiedenen Karzinomzelllinien (Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, Hepatozelluläres Karzinom, Blasenkarzinom, Mamma- und Cervixkarzinom und Myelom) eine sogar bis zu 6000-fache Suppression der Genexpression gezeigt werden (Abb. 4). Entsprechend der Markergenexpression war die nicht supprimierte Zytokinexpression, abgesehen von der Myelom-Zelllinie, dem konventionellen Cytomegalovirus-Promotor um 17 bis 4200-fach überlegen. Eine Doxycyclin-abhängige Suppression der Expression des TetR-VP16 Fusionsproteins konnte nach adenoviraler Infektion von HT29 Kolonkarzinom-Zellen im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 5). Interleukin-12 stimuliert in T-Lymphozyten die Expression von Interferon- γ . Diese Interferon- γ -Produktion als Ausdruck der Bioaktivität von Interleukin-12 kann ebenfalls nach Infektion von HT29-Zellen hochsignifikant durch Zugabe von Doxycyclin inhibiert werden (Abb. 6).

Die von uns entwickelten rekombinanten Adenoviren ermöglichen eine sehr hohe, sogleich aber hoch signifikant supprimierbare Genexpression durch Zugabe pharmakologi-

scher Doxycyclin-Konzentrationen. Diese Adenoviren werden die Sicherheit experimenteller gentherapeutischer Ansätze bei der adenoviralen Expression von Zytokinen und er damit erwünschten Aktivierung einer zellulären antitumoralen Immunantwort wesentlich verbessern.

Ausgewählte Literatur

1. K. Kozarsky, Curr Opin Genet Dev 3, 499-503. (1993)
2. M. Gossen, H. Bujard, PNAS 89, 5547-51. (1992)
3. M. Gossen et al., Science 268, 1766-69. (1995)
4. C. A. Strathdee et al., Gene 229, 21-9. (1999)
5. H. Tahara et al., Gene Ther 2, 96-106. (1995)
6. M. Caruso et al., PNAS 93, 11302-6. (1996).

Patentansprüche

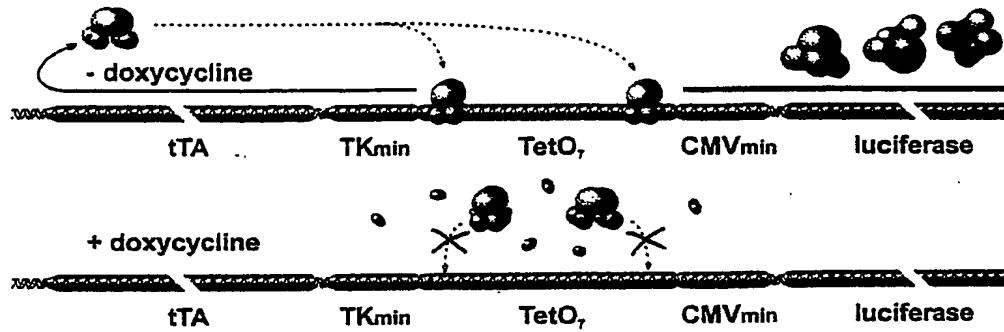
1. Rekombinanter viraler Vektor, dadurch gekennzeichnet, dass er einen bicistronischen Promotor enthält und er geeignet ist, zur Genexpression ein Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator-Fusionsprotein zu erzeugen.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ein Adenovirus, ein Adenoassoziertes Adenovirus (AAV), ein Retrovirus, insbesondere ein Humanes Immundefizienzvirus (HIV), ein Herpes Simplex Virus, ein Hepatitis-B Virus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
3. Vektor nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in die E1- und/oder die E3-Region eines rekombinanten Adenovirus ein Tetracyclin- und Doxycyclin-regulierbares System einkloniert ist.
4. Vektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, ferner ein Tet-Operator zur Bindung des Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator Fusionsproteins integriert ist.
5. Vektor nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Tet-Operator in die E1-Region integriert ist und der Tet-Operator von zwei Promotoren flankiert ist.

6. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator Fusionsproteins dient.
7. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Luciferase-Genes, eines Fluoreszenzprotein-Genes, eines Interleukin-12 Genes, eines Interleukin-18 Genes, eines Interleukin-2 Genes, eines single-chain Interleukin-12 Genes, eines Tumor Nekrose Faktor α -Genes, eines Interferon- γ Genes oder eines Interleukin-12 Genes dient.
8. Vektor nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Interleukin-2-, Interleukin-12-, single-chain Interleukin-12- und Interleukin-18-Gen ein humanes Interleukin-2-, Interleukin-12-, single-chain Interleukin-12- und Interleukin-18-Gen ist.
9. Vektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass einer der flankierenden Promotoren zur Expression eines Genes zur Apoptose-Induktion, des BAX Genes, des FAS-L Genes, eines Suizid-Genes, eines Thymidin-Kinase-Genes, eines Cytosin-Deaminase-Genes oder eines β -Galaktosidase-Genes dient.
10. Verfahren zur *in vitro*-Genexpression in eukaryoten Zelllinien, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Genexpression rekombinante Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 verwendet, bei denen die Genexpression durch einen bicistronischen Promotor

vermittelt und zur Genexpression ein Tetracyclin-Repressor / VP16-Transaktivator-Fusionsprotein erzeugt wird.

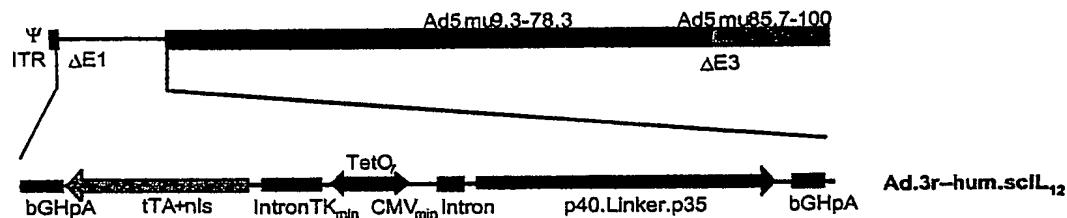
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Regulation der Genexpression Doxycyclin, Tetracyclin, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Demeclocyclin, Methacyclin, Minocyclin, verwendet.
12. Verfahren nach Anspruch 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, dass man Tet-Repressor-Fusionsproteine zur Tetracyclin-supprimierbaren Genexpression verwendet.
13. Verfahren nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, dass man Tet-Repressor-Mutanten-Fusionsproteine zur Tetracyclin-aktivierbaren Genexpression verwendet.
14. Verwendung der Vektoren nach den Ansprüchen 1 bis 9 in der Gentherapie.
15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Gentherapie maligner Erkrankungen.
16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die maligne Erkrankung ein solider Tumor ist.

Abbildung1



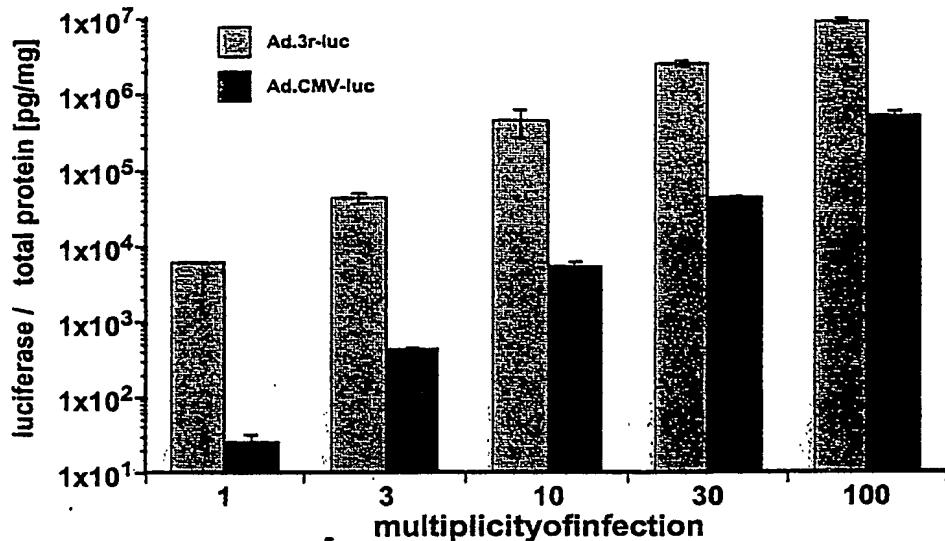
Prinzip der autoregulierten, Tetracyclin-abhängigen Transaktivator-Expression.

Abbildung2



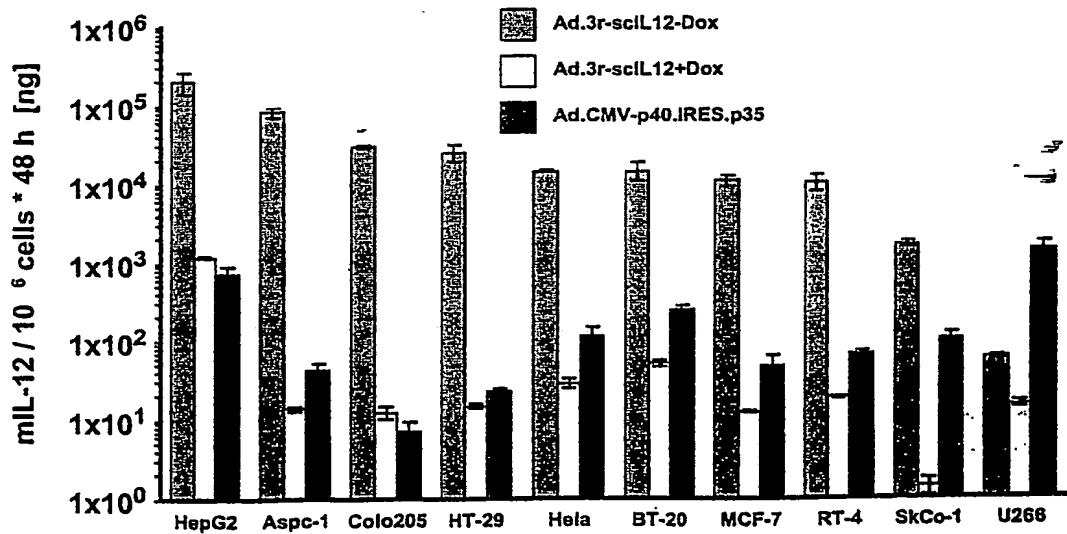
Adenovirale Vektorkarte. Die autoregulierte und Tetracyclin-supprimierbare Kassette ist in die E1-Region rekombinanter und replikationsdefizienter Adenoviren kloniert worden. Ein Intron oberhalb des p40.Linker.p35 Genes zur Expression eines humanen single-chain Interleukin-12 soll kryptisches Slicing verhindern und zur Stabilität der RNA beitragen.

Abbildung 3



Vergleich adenoviraler Genexpression unter Verwendung des Doxycyclin-regulierbaren 3r Promotor und des Cytomegalovirus-Promotors (CMV) nach Infektion von humanen Kolonkarzinom-Zellen (HT29) mit m.o.i. von 1 bis 100.

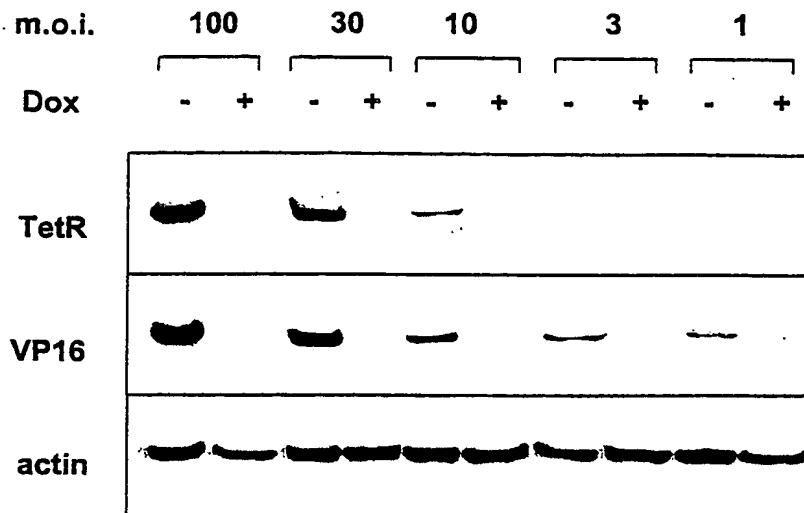
Abbildung 4



Interleukin-12 Genexpression nach adenoviraler Infektion verschiedener Karzinom-Zelllinien.

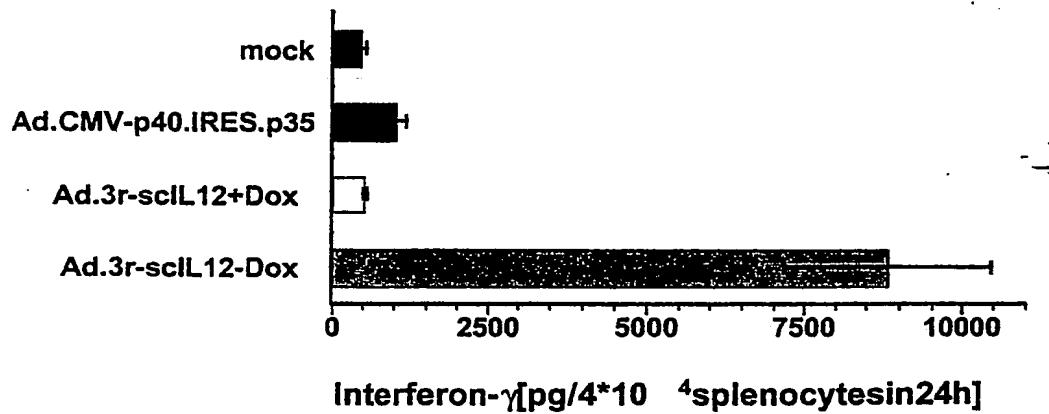
BEST AVAILABLE COPY

Abbildung5



Westernblot Analyse infizierter HT29 Zellen mit Ad.3r.scIL12 in An- und Abwesenheit von Doxycyclin. Nachgewiesen wurde eine m.o.i. und Doxycyclin-abhängige Expression beider Komponenten des TetR/VP16 Fusionsproteins.

Abbildung6



Nachweis der Bioaktivität von IL-12 nach Infektion von HT29 Zellen mit Ad.CMV-p40.IRES.p35 zur Cytomegalo virus-kontrollierten Genexpressions sowie Ad.3r-scIL12 +/- Doxycyclin.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft rekombinante adenovirale Vektoren, die durch Doxycyclin hocheffizient supprimiert werden können sowie deren Verwendung zur Durchführung einer Genexpression in eukaryoten Zellen, insbesondere im Rahmen einer Gentherapie.